

(19)대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)

(51) . Int. Cl.⁷
C07K 14/47

(45) 공고일자 2005년01월26일
(11) 등록번호 10-0468225
(24) 등록일자 2005년01월17일

(21) 출원번호	10-2002-0012409	(65) 공개번호	10-2003-0073037
(22) 출원일자	2002년03월08일	(43) 공개일자	2003년09월19일

(73) 특허권자 (주)뉴로제넥스
서울 관악구 신림동 산56-1 서울대학교 유전공학특화창업보육센터 312호

(72) 발명자 신동승
서울특별시 관악구 봉천본동 두산아파트 108-2104

박재용
서울특별시 영등포구 당산동3가 평화아파트 C-201

손호선
서울특별시 관악구 봉천본동 두산아파트 107-1205

강 안토니
서울 관악구 봉천5동 관악드림타운 110-1602

정연철
서울특별시 관악구 봉천5동 삼성아파트 133-1801

김경진
서울특별시 서대문구 대현동 럭키아파트 104-1102

(74) 대리인 남상선

심사관 : 박정웅

(54) 형광강도가 증강된 삽입형 녹색 형광 단백질 및 그유전자

요약

본 발명은 변종 녹색 형광 단백질 유전자 및 그 발현산물인 형광단백질 (inserted YFP)에 관한 것으로서, 외래의 단백질이나 단백질 부위 (domain)를 코딩하고 있는 염기서열을 삽입하여도 그 발현 산물이 37℃에서 형광을 유지하고 기존의 동종 단백질에 비해 20배에 달하는 형광 강도를 보임을 그 특징으로 하고 있다.

본 발명에서는 특정한 아미노산 서열을 형광 단백질 내에 삽입할 수 있도록 하기 위하여, DNA 염기서열상에서 특별히 목적인 돌연변이를 도입할 수 있도록 고안된 프라이머를 제조하였고, 이를 이용해서 돌연변이 유발형 PCR (error prone PCR)을 수행하고 이를 포유동물 세포주에서 유전자 운반체로 사용되는 pcDNA3에 클로닝하였다. 제조된 변종 녹색 형광 단백질 유전자를 세포내에 도입하고 그 형광의 강도가 강하게 유지되는 변종 형광단백질을 선별함으로써 여러 염기서열의 삽입이 가능하고, 그 발현산물이 강한 형광을 잃지 않는 변종유전자 및 그 변종 녹색 형광 단백질을 발명하게 되었다.

대표도

도 1a

백인어

녹색 형광 단백질(GFP), 황색 편이 녹색 형광 단백질(YFP), 삽입(insertion), 삽입형광단백질(inserted YFP), 단백질 분해 효소(protease), 단백질 분해 효소 기질(protease substrate), 절단 부위(cleavage domain), 단백질 결합 부위(binding domain), C형 간염바이러스(HCV), NS3단백질 분해 효소(NS3 protease)

명세서

도면의 간단한 설명

도 1a는 헬라(HeLa) 세포에 제조된 삽입형광단백질을 도입한 후 공초점 현미경으로 촬영한 A) Citrine-Ins, B) Y-Citrine, C) Peridot, D) Y-Citrine-5AB, E) Peridot-5AB의 형광사진

도 1b는 도 1a의 이미지를 정량화하여 제조된 삽입형광단백질들의 형광 강도를 비교한 그림

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 외부의 염기서열을 삽입함으로써 삽입된 염기서열의 세포내에서의 역할을 규명할 수 있도록 사용할 수 있는 형광 단백질에 관한 것이다.

녹색 형광 단백질 (GFP)은 유전자의 발현과 그 발현 산물인 단백질의 양적, 위치적 특성을 보고하는 리포터로서 광범위하게 사용되고 있으며 활용분야가 급격히 증가되고 있다. 다양한 목적에 적용되어 오면서 그 특성에 맞도록 고안된 새로운 변종 녹색 형광 단백질들이 만들어져 오고 있었다.

1998년 옥스포드그룹에서 녹색형광단백질 (GFP)내의 여러 위치에 외부 단백질이나 펩타이드를 삽입하여도 그 형광을 유지한다는 보고 (NAR 26:623-630)가 나온 후에, 첸 (R.Tsien) 그룹 등에서 보고한 삽입형광단백질 계열의 분자들이 사용되고 있다. 특히 첸그룹에서 보고하고 있는 삽입형광단백질의 경우 와이에프피인스 (YFPins)와 여기에 칼 모듈린이 삽입된 캄가루 (Camgaroo) 등이 있다. 기존의 삽입가능한 녹색 형광 단백질의 경우 1999년에 첸 등이 발표한 논문에서 따르면 145번 아미노산인 티로신 (Tyrosine)이 GGTGEL이라는 아미노산 서열로 변경되었고, 이부분에 도입된 KpnI, SacI 제한효소를 이용함으로써 외래의 염기서열을 클로닝 하도록 하였다 (PNAS 96:11241-11246). 이들에 의해서 만들어진 변종 형광 단백질은 37℃에서 형광을 거의 보이지 못하고 있었고, 28℃에서 형광을 보이는 특성을 보이고 있었다. 때문에 포유동물 세포주에서의 여러가지 세포내 활성을 측정하는 데에는 사용할 수 없다는 단점을 보이고 있었다. 같은 그룹에 따르면 이 캄가루 (Camgaroo)를 돌연변이를 유발시켜 얻은 69번 아미노산인 글루타민이 메치오닌으로 변한 Q69M돌연변이는 37℃에서 형광을 보이고 있는 것으로 보고되었다 (JBC,276:29188~29194).

본 발명자 등이 동일한 유전자를 제조하여 포유동물세포에 도입한 후 공초점 현미경으로 상을 잡아 본 결과 그 형광 강도가 매우 미약하여서 단백질의 결합 부위를 삽입하여 그 결합성의 변화를 보고자하는 연구나, 단백질 분해 효소에 대한 절단 부위를 삽입하는 등의 활용, 그리고 세포내의 칼슘 농도 측정 등이 거의 불가능함을 알 수 있었다. 따라서 외래 유전자의 삽입을 통한 연구가 현실적으로 가능하려면 삽입형광단백질의 형광 강도가 현저히 증가된 변종을 선별하고 이에 관한 연구가 선행되어야 했다.

본 발명은 이에 관한 것으로서 기존의 변종 단백질에서 제외되었던 145번 아미노산인 티로신을 도입하고 pcDNA3 운반체에 효율적으로 클로닝할 수 있도록 두 개의 제한효소 인지 부위 (BamHI, 및 NheI)를 도입하고 동시에 적절한 펩타이드 연결 부위를 도입할 수 있도록 프라이머를 디자인 하였고, 이를 사용하여 돌연변이를 많이 유발할 수 있도록 하는 피씨알 클로닝을 수행함으로써 빛이 강하게 유지되는 변종 형광 단백질을 개발하고자 하였다.

이 방법으로 선별된 변종 형광 단백질은 145번 아미노산 부위에 YGGSGAS라는 아미노산 서열을 갖는 특징이 있다. 이러한 특징을 갖는 변종 형광 단백질을 와이스트린 (Y-Citrine)이라 명명하였다. 이 부위는 기존의 변종 형광 단백질의 펩타이드 연결 부위와 비교하여 전기적성질을 거의 띠지 않고, 연결부위로서 작용할 수 있도록 고안되었고, 염기서열 상에서 유전자 운반체에는 존재하지 않는 제한 효소 인지 부위를 가지게 됨으로써 사용하는 유전자 운반체에서의 클로닝작업을 일회로 마칠 수 있는 특성을 가지게 된다.

또한 이 과정에서 새로운 돌연변이가 유발된 변종을 선별하였는데 이 변종단백질은 와이스트린이 가지고 있는 돌연변이 외에 192번 아미노산이 프롤린에서 라이신 (P192L)으로 변이 된것을 확인하였고 이를 페리도트 (Peridot)이라 명명하였다. 이는 와이스트린과 더불어 또 다른 삽입형 형광 단백질로서의 활용을 가능하게 해주는 것이었다.

본 발명에서 보여주고 있는 이 두종의 형광 단백질은 기존의 변종 형광 단백질에 비해 공초점 현미경에서 약 20배의

형광 강도를 보이고 있는 것으로 측정되었고, 이는 세포 수준의 약효평가에 사용할 수 있는 새로운 리포터의 출현을 의미하는 것이라 할 수 있다. 이렇게 새로이 만들어진 리포터 단백질을 이용하여 그 삽입부위에 단백질 분해 효소의 절단 부위, 단백질 결합부위등을 삽입하고 그 산물의 형광을 분석함으로써 세포내에서 벌어지는 다양한 생명현상을 분석할 수 있는 길을 열어 놓은 것이라 할 수 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명에서 개발하고자 한 것은 형광의 강도가 증강된 삽입형 황색 편이 녹색 형광 단백질 (inserted YFP)의 개발이었다. 이를 위해서는 새로운 높은 형광 강도를 보이는 돌연변이의 선별, 펩타이드 연결부위의 엔지니어링, 간편한 클로닝을 위한 제한효소 인지부위의 도입등이 필요하였다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 간편한 클로닝을 위해 제한 효소 인지 서열 (BamHI 및 NheI)를 도입하였다. 이는 현재 사용하고 있는 포유동물 세포용 유전자 운반체인 pcDNA3에는 존재하지 않는 제한 효소 인지부위이다. 이 제한 효소 인지 부위를 포함하는 YGGSGAS의 펩타이드 연결부위를 삽입하였다. 이 펩타이드 연결부위는 기존의 GGTGEL에 비해 전기적 성질을 최소화 하였고 이로 인한 구조적 변화를 줄이고자 하였다.

또한 이 변이와 PCR 과정을 통해 도입된 새로운 돌연변이에 의해 강한 형광을 보이는 변종 형광 단백질을 포유동물 세포주인 헬라 (HeLa) 세포주에서 선별함으로써 발명을 완성할 수 있었다. 도 1a에 나타낸 바와 같이 새로이 제조된 삽입형형광단백질은 기존의 쉐 그룹의 삽입형형광단백질인 시트린인스 (Citrine-ins)에 비해 현저히 증강된 형광 강도를 보임을 이미지를 통해 알 수 있었고, 도1b에 나타낸 바와 같이 이를 공초점 현미경 하에서 정량한 결과 20배 정도의 형광 강도를 보이는 것을 알 수 있었다.

이들 선별된 변종 형광 단백질 와이세트린과 페리도트의 삽입부위에 사람의 C형 간염 바이러스의 단백질 분해효소 (protease)인 NS3 단백질에 의한 절단 부위의 하나인 5AB 연결부위의 염기서열을 삽입하였을 때에도 그 형광을 유지하였고 이를 통해 세포수준에서의 C형 간염 바이러스의 단백질 분해효소의 활성을 평가할 수 있는 방법의 개발 등을 가능하게 하였다.

발명의 효과

본 발명은 포유동물 세포내에서 (37℃) 기존의 동종 단백질에 비해 그 형광강도가 20배에 달하는 삽입형형광단백질을 개발함으로써 다양한 단백질 부위의 삽입을 통한 연구를 현실화 할 수 있었다는 것과 포유동물 세포형 유전자 운반체에서의 클로닝이 한 단계로 간편해 졌다는 것을 특징으로 한다.

제조된 변종 형광단백질의 삽입부위에 C형 간염바이러스의 NS3 단백질 분해 효소(protease)의 절단부위인 5AB를 삽입하였을 때에도 그 형광을 유지한다는 데에서 5AB삽입형형광단백질(Y-Citrine-5AB 및 Peridot-5AB)를 기질로 이용하는 C형간염 바이러스 단백질 분해효소 활성 분석 시스템(HCV protease assay system)의 개발이 가능해졌음을 알 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 삽입형 형광단백질.

청구항 2.

제 1항의 형광단백질을 코딩하는 서열번호 1의 유전자 염기서열.

청구항 3.

삭제

청구항 4.

제 1항에 있어서, 제 192번 아미노산이 프롤린에서 라이신으로 치환됨 (P192L)을 특징으로 하는 형광단백질.

청구항 5.

제 4항의 형광단백질을 코딩하는, 서열번호 3의 유전자 염기서열.

청구항 6.

삭제

청구항 7.

제 1항 또는 제 4항에 있어서, 사람 C형 간염 바이러스의 NS3 단백질 분해효소 (HCV NS3)의 절단부위가 삽입됨을 특징으로 하는 삽입형 형광단백질.

청구항 8.

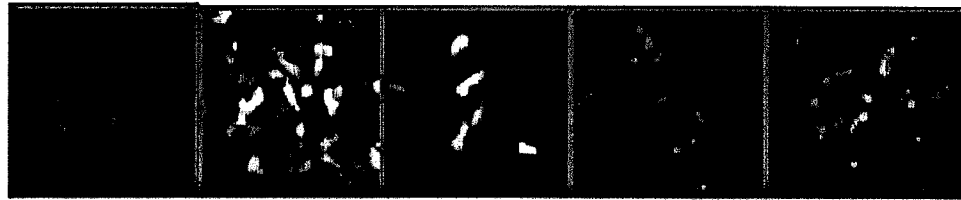
제 2항 또는 제 5항에 있어서, 유전자 클로닝을 위한 BamHI 및 NheI의 제한효소 인지 부위가 삽입됨을 특징으로 하는 유전자 염기서열.

청구항 9.

제 7항의 삼입형 형광단백질을 단백질 분해효소의 기질로서 사용하여 C형 간염 바이러스 단백질 분해효소의 활성을 분석하는 방법.

도면

도면1a



A)

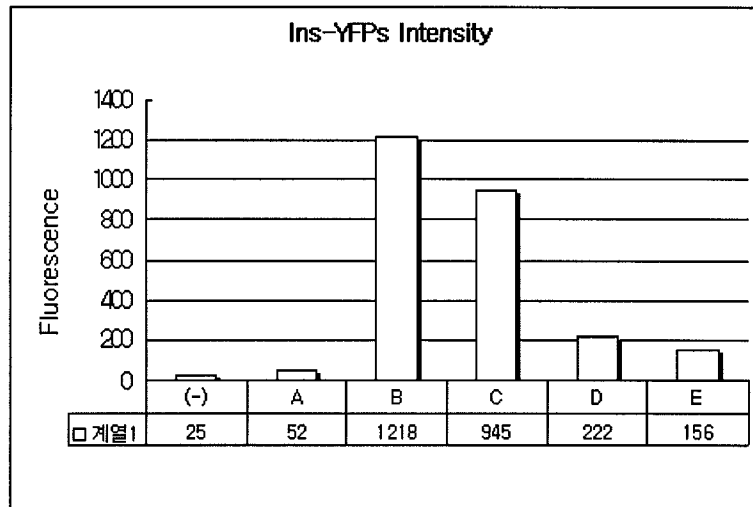
B)

C)

D)

E)

도면1b



```

<110>  NEUROGENEX Co.Ltd. <120>  Enhanced inserted YFP <160>  4 <170>  KopatentIn 1.71 <210>
1 <211>  738 <212>  DNA <213>  Aequorea victoria <220> <221>  CDS <222>  (1)..(735) <223>  y
-citrine DNA sequence <400>  1 atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg
  48 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu      1      5
    10      15      gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc
    96 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly      20
    25      30      gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc
   144 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile      35
    40      45      tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg act ac
   192 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr      50
    55      60      ttc ggc tac ggc ctg atg tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac atg
   240 Phe Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys      65
    70      75      80      cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc
   288 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
    85      90      95      cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc c
   336 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu      1
   400      105      110      gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc ga
   384 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly      11
   5      120      125      atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac
   432 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr      130
   135      140      aac tac ggt gga tcc ggt gct agc aac agc cac
   480 Asn Tyr Gly Gly Ser Gly Ala Ser Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met      145
  
```

150 155 160 gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg a
 ac ttc aag atc cgc cac 528 Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His
 165 170 175 aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gc
 c gac cac tac cag cag aac 576 Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn
 180 185 190 acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg
 ctg ccc gac aac cac tac ctg 624 Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Le
 u 195 200 205 agc tac cag tcc gcc ctg agc aaa
 gac ccc aac gag aag cgc gat cac 672 Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp
 His 210 215 220 atg gtc ctg ctg gag ttc gtg a
 cc gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg 720 Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
 Gly Met 225 230 235 240 gac gag ctg tac aag
 taa 738 Asp Glu Leu Tyr Lys
 245 <210> 2 <211> 245 <21
 2> PRT <213> Aequorea victoria <400> 2 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Le
 u 1 5 10 15 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His L
 ys Phe Ser Val Ser Gly 20 25 30 Glu Gly Glu Gly Asp Ala
 Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile 35 40 45 Cys Thr Thr
 Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr 50 55 60 Ph
 e Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys 65 70 7
 5 80 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala
 Glu 100 105 110 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg
 Ile Glu Leu Lys Gly 115 120 125 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly As
 n Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr 130 135 140 Asn Tyr Gly Gly Ser G
 ly Ala Ser Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met 145 150 155 1
 60 Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His 165
 170 175 Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn 180
 185 190 Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Le
 u 195 200 205 Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu L
 ys Arg Asp His 210 215 220 Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala
 Gly Ile Thr Leu Gly Met 225 230 235 240 Asp Glu Leu Tyr
 Lys 245 <210> 3 <211> 738 <212> DNA <213> Aequorea victoria <220> <221>
 CDS <222> (1)..(735) <223> Peridot DNA sequence <400> 3 atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc
 ggg gtg gtg ccc atc ctg 48 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15 gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc
 cac aag ttc agc gtg tcc ggc 96 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30 gag ggc gag ggc gat gcc acc tac g
 gc aag ctg acc ctg aag ttc atc 144 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe
 Ile 35 40 45 tgc acc acc ggc aag ctg ccc gt
 g ccc tgg ccc acc ctc gtg act acc 192 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val T
 hr Thr 50 55 60 ttc ggc tac ggc ctg atg tgc
 ttc gcc cgc tac ccc gac cac atg aag 240 Phe Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp Hi
 s Met Lys 65 70 75 80 cag cac gac ttc ttc aag
 tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag 288 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr
 Val Gln Glu 85 90 95 cgc acc atc ttc ttc a
 ag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag 336 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys
 Thr Arg Ala Glu 100 105 110 gtg aag ttc gag gg
 c gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc 384 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg I
 le Glu Leu Lys Gly 115 120 125 atc gac ttc aag
 gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac 432 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gl
 y His Lys Leu Glu Tyr 130 135 140 aac tac ggt
 gga tcc ggt gct agc aac agc cac aac gtc tat atc atg 480 Asn Tyr Gly Gly Ser Gly Ala Ser Asn Ser
 His Asn Val Tyr Ile Met 145 150 155 160 gcc gac a
 ag cag aag aac ggc atc aag gtg aac ttc aag atc cgc cac 528 Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys
 Val Asn Phe Lys Ile Arg His 165 170 175 aac at
 c gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac 576 Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln L
 eu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn 180 185 190 acc
 ccc atc ggc gac ggc ctc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg 624 Thr Pro Ile Gly Asp Gly Leu Va
 l Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu 195 200 205

```

agc tac cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac      672 Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser
Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His      210      215      220
    atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc act atc ggc atg      720 Met Val Leu Leu Glu Phe
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Ile Gly Met      225      230      235      2
40    gac gag ctg tac aag      taa      738 Asp Glu Leu Tyr Lys
                                     245
    <210> 4 <211> 245 <212> PRT <213> Aequorea victoria <400> 4 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Le
u Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu      1      5      10      15 Val Glu L
eu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly      20      25
    30 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile      35      40
        45 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr      50
            55      60 Phe Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys      65
                70      75      80 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly T
yr Val Gln Glu      85      90      95 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp
Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu      100      105      110 Val Lys Phe
Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly      115      120      125
    Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr      130      135
        140 Asn Tyr Gly Gly Ser Gly Ala Ser Asn er His Asn Val Tyr Ile Met      145      150
Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His      165      170
    175 Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn      180
185      190 Thr Pro Ile Gly Asp Gly Leu Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu      195
        200      205 Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His
            210      215      220 Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Ile
Gly Met      225      230      235      240 Asp Glu Leu Tyr Lys
            245

```